

Untersuchungen über Nachweis  
und Nachweiszeitraum von Librium und Valium  
in kleinen Blutmengen  
nach einmaliger Einnahme

INAUGURAL - DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Reinhold Baier

aus Rasdorf

Marburg 1968



Untersuchungen über Nachweis  
und Nachweiszeitraum von Librium und Valium  
in kleinen Blutmengen  
nach einmaliger Einnahme



INAUGURAL - DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Reinhold Baier

aus Rasdorf

Marburg 1968



Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Marburg am 19.12.1968

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof.Dr.W.STRAUB

Referent: Prof.Dr.F.SCHLEYER

Correferent: Prof.Dr.M.SIESS

Meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

## I n h a l t

|                                                          |         |
|----------------------------------------------------------|---------|
| A. <u>Einleitung</u> . . . . .                           | Seite 1 |
| I. <u>Psychopharmaca</u> . . . . .                       | 1       |
| 1. Euphorica . . . . .                                   | 1       |
| 2. Psychotomimetica . . . . .                            | 2       |
| 3. Neuroleptica = Major Tranquilizers . . . . .          | 2       |
| 4. Thymoleptica . . . . .                                | 2       |
| 5. Tranquillantien = Minor Tranquilizers . . . . .       | 3       |
| II. <u>Benzodiazepinabkömmlinge</u> . . . . .            | 6       |
| III. <u>Bisher angegebene Nachweismethoden</u> . . . . . | 11      |
| B. <u>Eigene Untersuchungen</u> . . . . .                | 15      |
| I. Vorversuche . . . . .                                 | 16      |
| II. Hauptversuche . . . . .                              | 30      |
| III. Die vorgeschlagene optimale Methodik . . . . .      | 34      |
| IV. Probandenversuche . . . . .                          | 36      |
| C. <u>Zusammenfassung</u> . . . . .                      | 45      |
| D. <u>Literatur</u> . . . . .                            | 46      |



## A. Einleitung

### I. Psychopharmaca

Die neue Entwicklung der Psychopharmakologie nahm ihren Ausgang von 3 Pharmaca:

1. Meproamat (MILTAUN, CYRPON, ANEURAL), das aus dem zentralen Muskelrelaxans Mephenesin entwickelt wurde.

2. Chlorpromazin (LARGACTIL, MEGAPHEN, THORAZIN), ein Antihistaminicum, bei dem zentrale Nebenwirkungen beobachtet wurden.

3. Reserpin (SEDARAUPIN, SERPASIL), ein Alkaloid aus Rauwolfia serpentina, das vorwiegend wegen seiner Wirkung gegen den Hochdruck verwendet wurde. Bei dieser Therapie zeigten sich die psychotropen Wirkungen, die zum Gebrauch in der Psychiatrie führten.

Der Wirkungsmechanismus der Psychopharmaca ist nicht bekannt. Die Terminologie der psychotropen Substanzen ist bei den verschiedenen Autoren unterschiedlich, die Zahl der Termini beträchtlich. KUSCHINSKI und LÜLLMANN unterscheiden zwischen:

1. Euphorica: diese Substanzen vermögen die Stimmungslage mancher Menschen zu erhöhen. Dazu gehören der Alkohol, Morphin, Cocain, die Weckamine Amphetamin (BENZEDRIN, ELASTONON), Metamphetamin (PERVITIN) und Phenmetrazin (PRELUDIN).

2. Psychotomimetica: diese Substanzen werden auch als Psychosomimetica, Psychodysleptica oder Halluzinogene bezeichnet. Sie können bei gesunden Menschen akut einen psychoseähnlichen Zustand auslösen. Zu dieser Gruppe gehören Haschisch („Marihuana“), Mescaline, die Indolderivate Psilocybin und Bufotenin, sowie Lysergsäurediäthylamid (LSD).

3. Neuroleptica = Major Tranquilizers: Hauptvertreter sind Promethazin (ATOSIL, PHENERGAN), Chlorpromazin (LARGACTIL, MEGAPHEN, THORAZIN) und seine Derivate Promazin (VEROPHEN), Perazin (PACATAL), Trifluorpromazin (PSYQUIL), Thioridazin (MELLERIL) und Chlorprothixen (TARACTAN, TRUXAL). Weiterhin gehören dazu die piperazinsubstituierten Phenothiazinderivate Perphenazin (DECENTAN), Fluphenazin (OMCA, LYOGEN) und Perazin (TAXILAN) sowie die Butyrophenone Haloperidol und Dehydrobenz-peridol und das Antisymphotonicum Reserpin.

Chlorpromazin und Verwandte haben ein weites Verwendungsgebiet gefunden in der Behandlung der Schizophrenie, bei manischen Zuständen sowie bei toxischen und senilen Psychosen. Weitere Verwendungsgebiete dieser Medikamente sind die Prämedikation vor Narkosen und die Neuroleptanalgesie.

4. Thymoleptica (Thymeretica): von den im wesentlich dämpfend wirkenden Neuroleptica werden die vorwiegend psychomotorisch erregenden Thymoleptica unter-

schieden. Diese Wirkung tritt nach einer Phase der Dämpfung nach etwa 2-3 Wochen auf. Thymoleptica haben sich besonders in der Behandlung der Depressionen bewährt. Die wichtigsten Verbindungen sind Imipramin (TOFRANIL), Desmethylimipramin (PERTOFRAN), Amitriptylin (LAROXYL, SAROTEN, TRYPTIZOL) und Nortriptylin (ACETEXA, NORTRILEN).

Thymoleptische Wirkungen haben auch einige Substanzen, die in vitro und in vivo das Ferment Monoaminoxidase hemmen. Die meisten der bisher verwendeten Hemmstoffe dieser Gruppe sind Hydrazinderivate. Ein erheblicher Nachteil dieser Stoffe sind die starken Nebenwirkungen an verschiedenen Organsystemen. Derartige Monoaminoxidasehemmstoffe sind zum Beispiel Nialamid (NIAMID), Phenelzin (NARDIL), Isocarboxazid (MARPLAN) oder Tranylcypromin (PARNATE).

5. Tranquillantien = Minor Tranquilizers: Stoffe dieser Gruppe sollen bei Angst und Spannungszuständen sowie Zwangsvorstellungen dämpfend wirken, ohne wie die sonst verwendeten Sedativa und Hypnotica gleichzeitig Müdigkeit hervorzurufen.

Das erste Tranquillans war das Meprobamat (CYRPON, ANEURAL, MILTAUN). Es ist chemisch und pharmakologisch dem mehrwertigen Alkohol Mephesisin verwandt, der als Muskelrelaxans mit Angriffspunkten im Rückenmark verwendet wurde. Meprobamat hat eine hemmende Wirkung auf Hirnstamm, basale Ganglien, Thalamus und auch poly-

synaptische Reflexe. Versuchstiere sollen nach Behandlung mit Meprobamat Furcht und feindliche Haltung verlieren und zahm und freundlich bei vollem Interesse an der Umgebung werden. Beim Menschen wurde eine entsprechende Hemmung emotioneller Reaktionen ohne eine Beeinträchtigung der Geschicklichkeit, Reaktionsfähigkeit und Denkfähigkeit beschrieben.

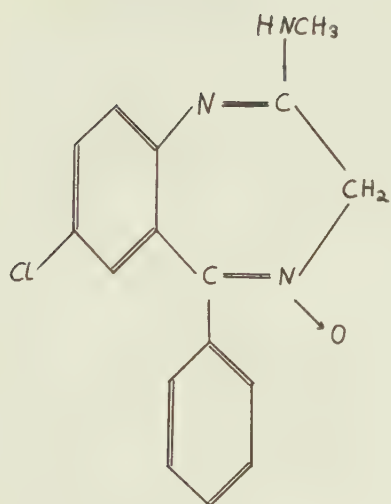
Einen ähnlichen, aber stärkeren Effekt als Meprobamat haben die Derivate des Benzodiazepins:

Chlordiazepoxyd (LIBRIUM) = 7-Chlor-2-methylamino-5-phenyl-3H-1.4-benzodiazepin-4-oxyl,

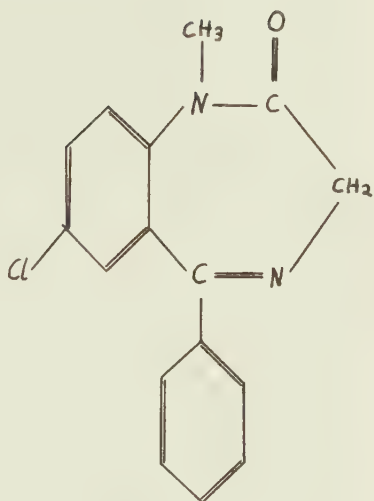
Diazepam (VALIUM) = 7-Chlor-1-methyl-5-phenyl-1.3-dihydro-3H-1.4-benzodiazepin-2-on,

Oxazepam (ADUMBRAN) = 7-Chlor-1.3-dihydro-3-hydroxy-5-phenyl-2H-1.4-benzodiazepin-2-on,

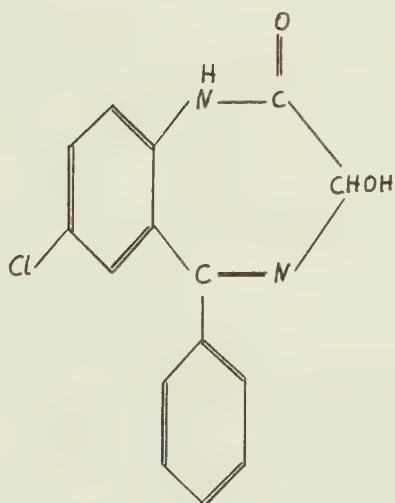
Nitrazepam (MOGADAN) = 1.3-Dihydro-7-nitro-5-phenyl-2H-1.4-benzodiazepin-2-on.



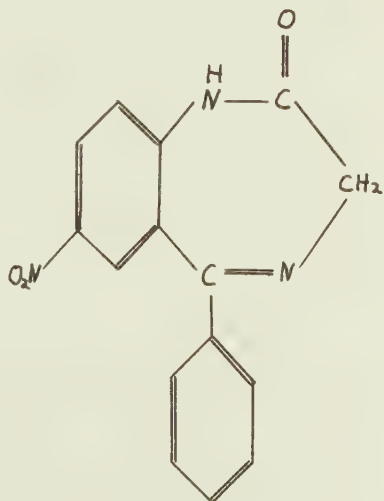
Chlordiazepoxyd



Diazepam



Oxazepam

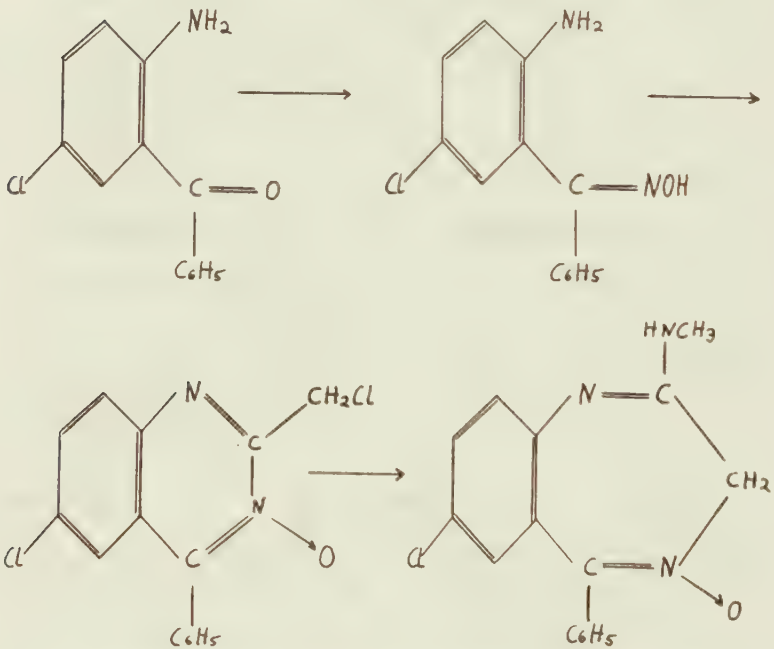


Nitrazepam

## II. Die Benzodiazepinabkömmlinge LIBRIUM und VALIUM

### LIBRIUM = Chlordiazepoxyd

Es wurde durch STERNBACH und REEDER (1) aus dem 2-Amino-5-chlorbenzophenon synthetisiert:



Von STERNBACH, KAISER und REEDER und STERNBACH und REEDER (2) wurden noch mehrere Substanzen mit psychotroper Wirkung synthetisiert. Dazu gehört auch das Diazepam = VALIUM. (s.u.)

Chlordiazepoxyd stellt eine farblose kristalline Substanz dar, die als Chlorhydrat in LIBRIUM-10-ROCHE Kapseln und als Base in LIBRIUM-5-ROCHE und LIBRIUM-25-ROCHE Dragees vorliegt. Als Kombinationspräparat mit anderen Substanzen kommt es noch in LIMBATRIL, LIBRAX und PENTRIUM vor. Es wurde von RANDALL, SCHALLEK, HEISE, KEITH und BAGDON pharmakologisch geprüft. Dabei wurde festgestellt, daß das Chlordiazepoxyd ähnliche Eigenschaften aufweist wie das Meprobumat.

LIBRIUM kommt vor allem eine zähmende Wirkung auf erregte Tiere und aggressive Affen zu (taming effect). Die zähmende Wirkung tritt bei den Tieren im Gegensatz zu anderen psychotropen Substanzen schon auf, bevor sie in ihrer Aktivität beeinträchtigt werden oder Ataxie zeigen. Diese Tatsache war ein Hinweis darauf, daß der Angriffsort der Substanz vielleicht im limbischen System (Gyrus hippocampi, Nucleus amygdalae) zu suchen sei. Durch Tierversuche wurde diese Annahme bestätigt. LIBRIUM dämpft dieses System bereits in Dosen, die andere Hirnbezirke noch nicht beeinflussen. Vermutlich bietet die selektive Dämpfung dieses Systems bereits eine Erklärung für den starken, spezifisch angstlösenden Effekt von LIBRIUM beim Menschen.

Über den Metabolismus und die Ausscheidung von Chlordiazepoxyd berichten PRIBILLA, RANDALL, SCHALLEK u. Mitarb., KOEHLIN und SCHWARTZ. KOEHLIN und SCHWARTZ konnten mittels radioaktiv markierter Sub-

stanz zeigen, daß die Halbwertszeit des Chlordiazepoxyds beim Menschen 20-24 Stunden, bei Hunden 14-20 und bei Ratten nur 4-6 Stunden betrug. Bei diesen Untersuchungen wurde außerdem noch festgestellt, daß nur sehr geringe Mengen unverändert mit dem Harn eliminiert werden. Zu demselben Ergebnis kam PRIBILLA mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie. Nach den Vermutungen der oben genannten Autoren wird vorwiegend das Abbauprodukt 2-Amino-5-chlor-benzophenon ausgeschieden.

Eine größere Zusammenstellung von Suizidversuchen mit Chlordiazepoxyd, die ohne Folgen überlebt wurden, gaben ZBINDEN, BAGDON, KEITH, PHILIPPS und RANDALL.

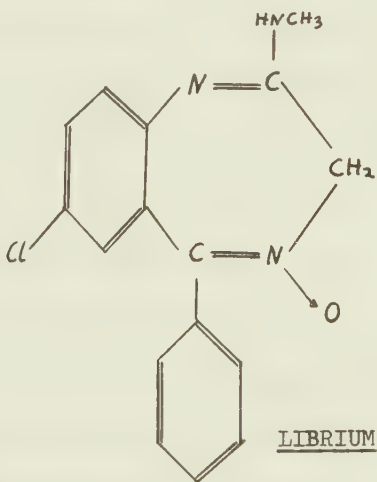
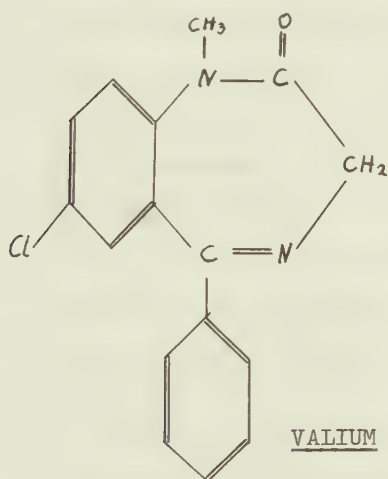
Die Nebenwirkung von Medikamenten mit psychotroper Wirkung, besonders die Gefahr einer Gewöhnung oder Sucht, beschreibt TSCHUDI-STEINER.

In der letzten Zeit werden die Auswirkungen einer gleichzeitigen Einnahme von Tranquillantien und Alkohol auf den Straßenverkehr diskutiert. Mit diesen Fragen beschäftigten sich DITT und FAUER, sowie KIEßHOLZ, GOLDBERG, IM OBERSTEG, POELDINGER, RAMSEYER und SCHMID. Die letztgenannten Autoren stellten fest, daß eine einmalige Applikation von 10 mg Chlordiazepoxyd oder 400 mg Meprobamat allein keine Beeinträchtigung der Fahrtüchtigkeit zur Folge hat. Bei gleichzeitiger Einnahme von Alkohol und Chlordiazepoxyd oder Meprobamat in den oben angegebenen Mengen war ebenfalls keine Beeinträchtigung der Fahrtüchtigkeit zu verzeichnen.

Dabei ist jedoch zu beachten, daß in der Praxis die Medikamente Chlordiazepoxyd und Meprobamat weitaus höher und über längere Zeiträume hinweg verordnet werden. Ob höhere Dosen Psychopharmaca die Reaktionsfähigkeit herabsetzen oder Alkoholfwirkungen potenzieren und dann als Grund für einen Verkehrsunfall angegeben werden, ist zur Zeit noch ungeklärt.

VALIUM = Diazepam

VALIUM wurde ebenfalls von STERNBACH und REEDER (2) synthetisiert. Aus der nachstehend wiedergegebenen Formel läßt sich die Verwandtschaft mit LIBRIUM, dem ersten klinisch verwendeten Benzodiazepin, ansehen.



Diazepam stellt wie das Chlordiazepoxyd eine farblose kristalline Substanz dar, die in Tablettenform zu 2, 5 und 10 mg im Handel ist (VALIUM-2-ROCHE, VALIUM-

5-ROCHE und VALIUM-10-ROCHE) und in Ampullen zu 10 mg.

Die pharmakologischen, biochemischen und toxikologischen Untersuchungen von RANDALL, SCHALLEK, SCH-ECKEL, BANZIGER, BORIS, MOE, BAGDON, SCHWARTZ und ZBINDEN ergaben, daß VALIUM hauptsächlich am zentralen Nervensystem angreift. Wie bei LIBRIUM wird das limbische System schon durch sehr kleine Dosen beeinflusst, während höhere Rindenzentren erst auf relativ hohe Dosen ansprechen. Das limbische System ist wahrscheinlich bei den emotionellen Reaktionen maßgeblich beteiligt. Man darf somit annehmen, daß die spezielle Affinität des Diazepam (ähnlich wie beim Chlordiazepoxyd) zum Hippocampus und dem Nucleus amygdalae für die klinische Wirksamkeit bei Angstzuständen und anderen emotionellen Störungen von Bedeutung ist. Die geringe Wirkung auf die Hirnrinde läßt vermuten, daß die tranquillisierenden Eigenschaften ohne wesentliche Beeinträchtigung des Sensoriums erzielt werden können. Diese Vermutung konnte durch Tierversuche bestätigt werden.

VALIUM besitzt gegenüber LIBRIUM eine stärker muskelrelaxierende Wirkung durch Hemmung spinaler Reflexe und beträchtliche antikonvulsive Eigenschaften. Das kardio-vasculäre System wird durch VALIUM wenig beeinflusst.

Ausgedehnte Verträglichkeitsprüfungen an vier verschiedenen Tierarten ergaben keine Hinweise auf Toxizität. VALIUM zeigte keinen Einfluß auf das endokrine System und hatte an Ratten keine teratogene Wirkung.

Weitere metabolische, enzymatische und allgemein pharmakologische Untersuchungen ergaben keine weiteren für die Wirkung am Menschen wesentlichen Eigenschaften.

### III. Bisher angegebene Nachweismethoden

Im Laufe der Zeit wurden für LIBRIUM und VALIUM eine Reihe von Nachweismethoden erarbeitet. Die Empfindlichkeit dieser Methoden gestattete es, noch Bruchteile eines Mikrogramms dieser Substanzen sicher nachzuweisen. Dazu bediente man sich der folgenden Verfahren:

Papierchromatographie,  
Dünnschichtchromatographie,  
Spektrophotometrie,  
Spektrofluorometrie,  
Gaschromatographie,  
Polarographie,  
Markierung mit radioaktiven Isotopen.

Dünnschichtchromatographisch läßt sich LIBRIUM mit Hilfe des Reagens nach DRAGENDORFF unter Bildung von rotbraunen Flecken gut anfärben (BÄUMLER und RIPPSTEIN). Im Gemisch Methanol-Aceton-Triäthanolamin (1:1:0.03) als Fließmittel zeigt LIBRIUM einen  $R_f$ -Wert von 0.85; bei Verwendung von Benzol wandert es nicht.

Nach BÄUMLER und RIPPSTEIN ergibt LIBRIUM im UV-

Licht bräunliche Flecken, die UV-Absorption besitzt bei 264  $\mu$  ein Maximum, das gegen das kurzwellige Licht hin abnimmt und bei 242-250  $\mu$  ein kleines Plateau zeigt.

Ebenfalls BÄUMLER und RIPPSTEIN zeigten, daß LIBRIUM beim Stehen in wässriger Lösung oder beim Erwärmen mit Säuren zu 2-Amino-5-chlor-benzophenon abgebaut wird. Das Hydrolyseprodukt verwendeten sie nach Diazotierung mit Nitritlösung und Kupplung in alkalischer beta-Naphthollösung zum indirekten Nachweis für LIBRIUM.

Dieses Verfahren benutzten sie auch bei der Untersuchung von Blut- und Urinproben.

Das Untersuchungsmaterial wird dabei mit 10-30 ml Salzsäure (36-proz.) 2 Stunden auf dem Wasserbad erhitzt, nach dem Abkühlen mit festem Natriumhydroxyd neutralisiert, ausgeäthert, der ätherische Auszug wird eingedampft. Chromatographiert wird auf Kieselgelplatten. Fließmittel ist Benzol.

Der  $R_f$ -Wert von 2-Amino-5-chlor-benzophenon liegt bei 0,5. Nach Kupplung mit beta-Naphthol in alkalischer Lösung bildet sich der rote Azofarbstoff 1-(4-Chlor-2-benzoyl-phenyl-(1)-azo)-2-hydroxy-naphtalin. Mit Hilfe dieser Farbreaktion lassen sich noch Bruchteile eines Mikrogrammes gut nachweisen.

In der gleichen Weise benutzen BÄUMLER, GANDER und IM OBERSTEG das 2-Amino-5-chlor-benzophenon zum indirekten LIBRIUM-Nachweis mittels der Dünnschichtchromatographie und Spektrophotometrie in Blut- und Urinproben. Das an einer kleinen Kieselgelsäule (Eluationsmittel: Benzol) gereinigte 2-Amino-5-chlor-benzophenon zeigt im UV-Licht ein Maximum bei 383  $\mu$  und ein Mini-

mum bei 303 mp.

Nach PRIBILLA ist die Reaktion von 2-Amino-5-chlor-benzophenon mit N-(1-Naphthyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid wesentlich empfindlicher als mit beta-Naphthol-Reagens. Sie wurde ebenfalls spektralphotometrisch ausgewertet. mit beta-Naphthol-Reagens waren noch Mengen von 2 µg absolut zu erfassen, mit N-(1-Naphthyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid dagegen noch 0.7 µg sicher nachzuweisen.

Eine empfindliche Nachweismethode mit Hilfe der Spektrofluorometrie für LIBRIUM und eines seiner Abbauprodukte mit Lactam-Charakter beschreiben KOEHLIN und D'ARCONTE. Sie bestimmten so den Plasmaspiegel von LIBRIUM und des Metaboliten nach verschiedenen Dosen bei Menschen, Hunden und Ratten.

OELSCHLAGER gibt eine Nachweismethode für LIBRIUM mittels der Gleichstrompolarographie an. Sicher nachzuweisen waren damit noch  $3 \times 10^{-6}$  Mol Chlordiazepoxyd.

OELSCHLAGER, VOLKE und KUREK fanden, daß VALIUM auf Grund seiner Rotbraun-Färbung mit DRAGENDORFF-Reagens dünnschichtchromatographisch bis zu Mengen von etwa 8 µg identifiziert werden kann ( $R_f$ -Wert = 0.75; basisches Aluminiumoxyd „Woelm“/Aceton).

Auf Alusil-Platten, die im kurzwelligen UV-Licht (254 mp) fluoreszieren, können noch 3 µg Diazepam nachgewiesen werden.

Indirekt läßt sich das farblose Diazepam auch durch

das bei der sauren Hydrolyse des Diazepin-Ringes entstehende gelbe 2-Methylamino-5-chlor-benzophenon nachweisen. Dieses ist sowohl auf Grund seiner Eigenfärbung, als auch durch Fluoreszenzlöschung auf Alusil-Platten noch in Konzentrationen bis zu 3  $\mu\text{g}$  zu erkennen ( $R_f$ -Wert = 0.7; Alusil/Chloroform). Sein UV-Spektrum zeigt bei 236  $\text{m}\mu$  ein charakteristisches Absorptionsmaximum, das dem des Diazepams bei 230  $\text{m}\mu$  sehr nahe liegt.

LANGNER schlägt eine spektrofluorometrische Analysenmethode vor, mit der es möglich ist, VALIUM noch in Mengen von 0.1  $\mu\text{g}$  nachzuweisen.

Über eine sehr empfindliche Nachweismethode für VALIUM und LIBRIUM im Blut mit Hilfe der Gaschromatographie berichten de SILVA, SCHWARTZ, STEFANOVIC, KAPLAN und D'ARCONTE. Der Nachweis wird dabei über die Hydrolyseprodukte 2-Methylamino-5-chlor-benzophenon bzw. 2-Amino-5-chlor-benzophenon geführt. Die Nachweisgrenze liegt bei 0.02-0.03  $\mu\text{g}$  Substanz pro ml Blut.

WEIST und SCHMID geben eine dünnschichtchromatographische Methode zum Schnellnachweis verschiedener Benzodiazepin- und Dibenzazepinderivate an. Dabei wird mit der sog. Mikroplattenmethode gearbeitet. Es gelingt so, nach Extraktion des biologischen Materials innerhalb von 10 min die Gruppe der Tranquilizer ADUMBRAN, MOGADAN, VALIUM und LIBRIUM von den Thymoleptica TOFRANIL, PERTOFRAN und NOVERIL zu trennen. Die Platten werden dazu im filtrierten UV-Licht von 365  $\text{m}\mu$  nach vorheriger Anfärbung mit Cer(IV)-sulfat-Schwefelsäure betrachtet.

## B. Eigene Untersuchungen

Der Nachweis einer kombinierten Alkohol-Medikament-Aufnahme gewinnt durch den immer grösser werdenden Konsum von Arzneimitteln aller Art zunehmend an Bedeutung. Die sich durch gleichzeitige oder zeitlich dicht beieinanderliegende Aufnahme von Medikamenten und Alkohol ergebenden Fragen interessieren ausser dem Pharmakologen, Toxikologen und Internisten auch den Sachverständigen für gerichtliche oder für Verkehrsmedizin, von dem im konkreten Fall der Nachweis einer bestimmten Substanz im Blut und dann eine Begutachtung dieser Kombinationswirkung verlangt wird.

Der Blutalkoholwert zur Tatzeit ist je nach Entnahmezeit genau bekannt oder doch hinreichend genau rechnerisch bestimmbar. Die tatsächliche oder angebliche gleichzeitige Aufnahme von Alkohol und Medikamenten muss aber häufig erst längere Zeit nach Entnahme der Blutprobe in dem nach der Alkoholbestimmung noch verbliebenen Blutrest festgestellt werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, eine sichere, schnelle und gut reproduzierbare Nachweismethode für LIBRIUM und VALIUM in kleinen Blutmengen auszuarbeiten, die es gestattet, selbst Mengen unter 1 Mikrogramm der beiden Substanzen noch einwandfrei zu erfassen.

## I. Vorversuche

### 1. Versuche zur Darstellung der Säurehydrolysate von LIBRIUM und VALIUM mit 4n und 2n Salzsäure

#### Ansatz I:

10 Kapseln LIBRIUM-10-ROCHE (1 Kapsel enthält 10 mg  
7-Chlor-2-methylamino-5-phenyl-3H-1.4-benzodiazepin  
-4-oxyl-hydrochlorid),  
30 ml Aqua bidest.,  
20 ml konzentrierte Salzsäure.

#### Ansatz II:

10 Tabletten VALIUM-10-ROCHE (1 Tablette enthält 10  
mg 7-Chlor-1.3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-2H-1.4-  
benzodiazepin-2-on),  
30 ml Aqua bidest.,  
20 ml konzentrierte Salzsäure.

Der Inhalt von 10 Kapseln LIBRIUM-10-ROCHE oder 10  
Tabletten VALIUM-10-ROCHE wurde in einen 100 ml-Schliff=  
kolben gegeben. Dazu wurden noch 30 ml Aqua bidest. und  
20 ml konzentrierte Salzsäure einpipettiert. Nach der  
Zugabe der Salzsäure lösten sich die Substanzmengen voll=  
ständig auf. Die Lösungen waren schwach gelblich und  
etwas getrübt. Der Kolbeninhalt wurde nun 120 min am  
Rückflußkühler zum Sieden erhitzt. Nach etwa 10 min Er=  
hitzen klärten sich die Lösungen und wurden intensiv  
gelb. Nach weiteren 10 min verfärbten sie sich dunkel=  
gelb. Die Hydrolyse wurde nach 120 min Dauer unterbro=

chen, und der Kolbeninhalt zum Abkühlen in den Kühltisch gestellt. Darauf wurde er mit festem Natriumhydroxyd alkalisch gemacht und nochmals gekühlt, anschließend 3 mal mit frisch destilliertem Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherfraktionen wurden mit ge-  
glühtem, wasserfreien Natriumsulfat getrocknet und dann nach Filtration auf einem Wasserbad eingeeengt. Der Rückstand wurde dann mit 96%igem Äthanol aus dem Destillationskolben in eine kleine Glasschale überführt, und darauf der Alkohol auf dem Wasserbad verjagt. Die Farbe des Ätherextraktes war dunkelgelb.

In einem zweiten Hydrolyseverfahren wurden dieselben Mengen LIBRIUM und VALIUM verwendet, aber statt 4n Salzsäure wie im ersten wurde bei diesem zweiten Versuch nur mit 2n Salzsäure hydrolysiert. Die weitere Behandlung war die gleiche wie oben beschrieben. Das Verhalten und die farblichen Änderungen bei der Hydrolyse gingen in ähnlicher Weise vor sich.

2. Versuche zur papierchromatographischen und dünn-  
schichtchromatographischen Differenzierung  
der Hydrolyseprodukte

a) Papierchromatographie der Ätherextrakte

Die einzelnen Hydrolysate wurden in Alkohol gelöst und mit einer Mikropipette auf je einen Startpunkt eines Papierchromatogramms Nr. 2043 a (Schleicher & Schüll) aufgebracht.

Fließmittel A:

216 ml n-Butanol,

126 ml Aqua bidest.,

18 ml 15%ige Ameisensäure.

Fließzeit:

18 Stunden

R<sub>F</sub>-Wert:

0.95

Fließmittel B:

Benzol

Fließzeit:

6 Stunden

R<sub>F</sub>-Wert:

0.95

Vor dem Eintauchen in das Fließmittel wurden die Filterpapierstreifen 30 min in der Dampfphase über dem Fließmittel konditioniert. Nach dem Entwickeln und Trocknen der Chromatogramme mit einem Heißluftstrom

wurden die Substanzflecke, die alle fast an der Fließmittelfront lagen, mit folgenden Sprühreagentien auf ihre Anfärbbarkeit geprüft:

A. Sprühreagens I:

Lösung A:

5.0 ml tert. Butylnitrit (FLUKA),

2.5 ml n-Butanol,

0.5 ml Eisessig;

nach 2-3 min nachbehandeln mit

Lösung B:

20 mg N-(1-Naphthyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid,

20 ml n-Butanol,

1 ml 2n Salzsäure.

B. Sprühreagens II (STAHL Nr. 39):

Lösung A:

1.0 g Natriumnitrit in 100 ml 1n Salzsäure gelöst;

nach 1 min Reaktionszeit nachsprühen mit

Lösung B:

0.2%ige Lösung von beta-Naphthol in 1n Kalilauge.

C. Reagens nach DRESSLER

1.3-Dinitrobenzol + 20%ige methanolische Kalilauge.

D. DRAGENDORFF's Reagens

Die Hydrolysate von LIBRIUM-Kapselinhalt ließen sich gut mit den Sprühreagentien I und II anfärben. Es bildeten sich intensiv rot-violette bzw. orange-rote Farbflecke auf den Papierchromatogrammen. Keine Farbreaktionen traten

auf nach dem Besprühen mit DRAGENDORFF's und DRESLER's Reagens.

Das aus VALIUM-Tabletten gewonnene Säurehydrolysat hatte eine starke gelbe Eigenfarbe. Es ließ sich mit keinem der oben angegebenen Sprühreagentien anfärben.

Beim Vergleich der Papierchromatogramme, die nach Hydrolyse von LIBRIUM-Kapselinhalt und VALIUM-Tabletten mit 4n und 2n Salzsäure angefertigt wurden, fiel auf, daß bei dem Hydrolyseverfahren mit 2n Salzsäure die Substanzflecke grösser waren und sich auch deutlicher anfärben ließen. Deswegen sollte die Konzentration der Salzsäure bei der Hydrolyse nicht über 2n hinausgehen, da sonst auch die zum Nachweis benutzten Abbauprodukte angegriffen werden.

Versuche, mit Hilfe der Papierchromatographie eine einwandfreie Trennung von Ausgangssubstanz und Abbauprodukt zu erzielen, hatten kein verwertbares Ergebnis.

b) Dünnschichtchromatographie der Ätherextrakte

Dazu wurden Glasplatten im Format 20 x 20 cm mit Kieselgel G MERCK beschichtet:

30 g Kieselgel G MERCK wurden unter ständigem Umrühren mit einem Glasstab mit 65 ml Aqua bidest. gut durchmischt. Dann wurde die dünnflüssige, homogene Masse in das Dünnschichtstreichgerät der Firma C. Desaga eingefüllt, nachdem es vorher auf eine Schichtdicke von 0.25 mm eingestellt worden war. In einem Zug wurde dann die Masse gleichmässig auf die entfetteten Glasplatten aufgetragen. Bis zum vollständigen Abbinden (nach etwa 4-5 min) wurden die Platten auf der Arbeitsschablone belassen. Anschliessend wurde auf allen Platten die Streichrichtung gekennzeichnet, um bei den nachfolgenden Trennungen gleiche Bedingungen einhalten zu können.

Das bei der Dünnschichtchromatographie häufig auftretende Randphänomen wurde dadurch ausgeschaltet, daß in Laufrichtung an beiden Seiten des Chromatogramms ein 7-8 mm breiter Streifen der Gelschicht entfernt wurde.

Die Startlinie wurde 2.5 cm vom unteren Rand der Platte entfernt gewählt. Der Abstand der Startpunkte untereinander betrug 2 cm. Bei allen Versuchen wurde eine Laufstrecke von 15 cm eingehalten.

Unmittelbar vor dem Auftragen der Substanzen wurden die Kieselgel G-Platten 5 min bei 110° C im Trockenschrank aktiviert. Beim Auftragen der Atherextrakte mit Mikropipetten wurde streng darauf geachtet, daß der Startpunkt einen Durchmesser von maximal 5 mm nicht überschritt.

Die so vorbereiteten Dünnschichtchromatogramme wurden zum Konditionieren 30 min in die Trennkammer gestellt, die als Fließmittel Benzol enthielt. Nach 30 min wurde dann die Platte in das Fließmittel eingetaucht. Dieses wanderte in der Kieselgelschicht nach oben bis zur markierten Grenze. Die Laufzeit betrug im Durchschnitt 35-40 min. Nachdem die markierte Frontgrenze erreicht war, wurde die Platte aus der Trennkammer genommen und im Warmluftstrom getrocknet.

Nach diesem Verfahren wurden 4 Dünnschichtchromatogramme hergestellt. Aufgetragen wurden je eine Reihe von 10-90 µg und eine zweite von 1-9 µg des LIBRIUM- oder VALIUM-Hydrolysates.

Die Chromatogramme mit dem aufgetragenen LIBRIUM-Abbauprodukt wurden mit Sprühreagens I und II behandelt. Alle Substanzflecke zeigten eine intensiv rot-violette (Sprühreagens I) oder orange-rote (Sprühreagens II) Farbe. Durchmesser und Farbtintensität der Flecke waren je nach aufgetropfter Menge verschieden. Das Besprühen mit der Sprühlösung II ergab eine weniger intensive Anfärbung.

Die Substanzflocke des VALIUM-Abbauproduktes hatten eine starke gelbe Eigenfarbe. Sie waren deutlich auf der weißen kieselgelschicht zu erkennen.

Innerhalb der angegebenen Grenzen von 1-90  $\mu\text{g}$  übten die verschiedenen Konzentrationen keinen Einfluß auf den  $R_f$ -Wert aus, der bekanntlich der Quotient von Laufstrecke der Substanz zu Laufstrecke des Fließmittels ist. Zur genauen Bestimmung des  $R_f$ -Wertes wurden die Entfernung vom Startpunkt bis zur Substanzfleckmitte und die Entfernung des Startpunktes bis zur Fließmittelfront gemessen. Die so erhaltenen Zahlenwerte wurden dann dividiert.

Bei Verwendung von Kieselgel G MERCK als stationäre und Benzol als mobile Phase ergaben sich die folgenden Werte für die Säurehydrolysate von LIBRIUM und VALIUM:

$$R_f \text{ (LIBRIUM-Hydrolysat)} = 0.31$$

$$R_f \text{ (VALIUM-Hydrolysat)} = 0.59$$

Die Dünnschichtchromatographie erwies sich als ein geeignetes Trennungsverfahren für die Säurehydrolysate von LIBRIUM und VALIUM.

Für die Festlegung der Grenzkonzentrationen, bei denen ein sicherer Nachweis noch gelingt, ist es erforderlich, die Abbauprodukte von LIBRIUM und VALIUM nach Säurehydrolyse chemisch rein darzustellen. Damit können dann genau definierte Standardlösungen für die Testanalysen angesetzt werden.

3. Reindarstellung von 2-Amino- und 2-Methylamino-5-chlor-benzophenon

Ansatz A:

500 mg LIBRIUM-Reinsubstanz (= 7-Chlor-2-methylamino-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepin-4-oxyd-hydrochlorid),

30 ml Aqua bidest.,

10 ml konzentrierte Salzsäure.

500 mg der LIBRIUM-Reinsubstanz wurden auf der Analysenwaage abgewogen und zusammen mit 30 ml Aqua bidest. in einen 100 ml-Rundkolben gegeben. Die Substanzmenge löste sich sofort unter leichter Gelbfärbung. Dazu wurden noch 10 ml konzentrierte Salzsäure eingegeben, und dann wurde das Gemisch 120 min am Rückflußkühler gekocht. Nach etwa 10 min verfärbte sich die anfänglich schwach-gelbliche Lösung und nahm einen tief-gelblichen Farbton an. Die Hydrolyse wurde nach 120 min unterbrochen, das Reaktionsgemisch in Eiswasser abgekühlt und nach dem Erkalten mit 20 Natriumhydroxyd alkalisch gemacht. Dabei fiel das LIBRIUM-Abbauprodukt 2-Amino-5-chlor-benzophenon in Form von orange-gelben Flocken aus. Durch dreimalige Extraktion mit frisch destilliertem, peroxydfreiem Äther wurde es abgetrennt, darauf wurden die vereinigten Ätherfraktionen mit gechlühtem Natriumsulfat entwässert. Anschließend folgte die Abdestillation auf dem Wasserbad und das Überführen des Rückstandes aus dem Destillationskolben in eine kleine tarierte

Glasschale (17.1214 g). Nachdem der Inhalt der Glasschale zur Trockne gebracht worden war, erneutes Wiegen:

Glasschale + Rückstand = 17.4639 g.

Durch Subtraktion des Leergewichtes errechnet sich die Menge des gewonnenen LIBRIUM-Abbauproduktes 2-Amino-5-chlor-benzophenon auf 342.5 mg = 99.4% der Theorie.

Ansatz B:

500 mg VALIUM-Reinsubstanz (= 7-Chlor-1.3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-2H-1.4-benzodiazepin-2-on),

30 ml Aqua bidest.,

10 ml konzentrierte Salzsäure.

Bei diesem Hydrolyseverfahren zur Gewinnung des VALIUM-Abbauproduktes 2-Methylamino-5-chlor-benzophenon wurde in der gleichen Weise vorgegangen wie bei der Herstellung des LIBRIUM-Abbauproduktes 2-Amino-5-chlor-benzophenon. Das Verhalten bei der Hydrolyse und bei der Alkalisierung war ähnlich. Es wurde hierbei eine Ausbeute von 95.6% der Theorie erreicht.

Reinigung der Hydrolyseprodukte

Die beiden durch Hydrolyse gewonnenen Abbauprodukte von LIBRIUM und VALIUM wurden säulenchromatographisch gereinigt. Dazu wurde Kieselgel G MERCK in reinem Benzol angeteigt, und anschließend die Aufschlämmung in eine Chromatographiesäule eingefüllt. Darauf wurden die beiden in Benzol gelösten Hydrolyseprodukte (in je eine Säule) gegeben und solange unter Vacuum mit reinstem Benzol

eluiert, bis die gelb gefärbten Fraktionen separat abgetrennt waren.

Danach wurden die so gereinigten Substanzen in einer kleinen Glasschale auf dem Wasserbad zur Trockne eingedampft. Es wurde in beiden Fällen ein reingelbes Kristallpulver erhalten.

### Schmelzpunktsbestimmung der Hydrolyseprodukte

#### LIBRIUM-Säurehydrolysat:

1. Bestimmung: Fp. = 98.5° C  
Krist.p. = 97.5° C
2. Bestimmung: Fp. = 99.0° C  
Krist.p. = 98.0° C

#### VALIUM-Säurehydrolysat:

1. Bestimmung: Fp. = 97.0° C  
Krist.p. = 95.0° C
2. Bestimmung: Fp. = 96.0° C  
Krist.p. = 95.0° C

Diese Werte, sowie Farbe, Reaktion mit beta-Naphthol und N-(1-Naphthyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid, fehlende Reaktion nach Besprühen mit DRAGENDORFF's Reagens stimmen überein mit den Angaben von PRIBILLA und BÄUMLER, GANDER und IM OBERSTEG für das Säurehydrolyseprodukt von LIBRIUM (2-Amino-5-chlor-benzophenon).

Der  $R_f$ -Wert für das Abbauprodukt wird unterschiedlich angegeben. BÄUMLER, GANDER und IM OBERSTEG fanden mit Benzol als Fließmittel einen  $R_f$ -Wert von 0.5 für das 2-Amino-5-chlor-benzophenon, PRIBILLA mit demselben

Fließmittel einen  $R_f$ -Wert von 0.4. Bei den hier beschriebenen Versuchen ergab sich ein  $R_f$ -Wert von 0.34 für das LIBRIUM-Abbauprodukt.

Der für das VALIUM-Abbauprodukt gefundene Schmelzpunkt ist identisch mit dem von OELSCHLÄGER, VOLKE und KUREK gefundenen Wert für 2-Methylamino-5-chlor-benzophenon. Der  $R_f$ -Wert mit Benzol als Fließmittel betrug 0.59.

#### 4. Versuche zur Festlegung der Nachweisgrenze

Von großer Wichtigkeit war nun, diejenige Menge 2-Amino-5-chlor-benzophenon bzw. 2-Methylamino-5-chlor-benzophenon festzustellen, die gerade noch (mit Hilfe eines Sprühreagens oder durch Fluoreszenz) nachweisbar ist.

Auf 2 Kieselgel G-Platten wurden 0.1-0.9  $\mu\text{g}$  und 1-9  $\mu\text{g}$  des gereinigten Säurehydrolysates von LIBRIUM aufgetragen und mit den folgenden Sprühreagentien behandelt:

- A. Sprühreagens I,
- B. Sprühreagens II,
- C. DRAGENDORFF's Reagens,
- D. Reagens nach DRESSLER.

Sprühreagens I war das empfindlichste der 4 geprüften Sprühmittel. Selbst 0.1  $\mu\text{g}$  2-Amino-5-chlor-benzophenon waren noch einwandfrei auf dem Dünnschichtchromatogramm nachzuweisen.

Sprühreagens II zeigte eine mittlere Empfindlichkeit. Substanzmengen von  $0.3 \mu\text{g}$  ab waren noch zu erkennen.

Keine zur Identifizierung des LIBRIUM-Abbauproduktes verwertbaren Farbreaktionen lieferten das Besprühen mit DRAGENDORFF's oder DRESSLER's Reagens.

Für die Festlegung der Nachweisgrenze des VALIUM-Abbauproduktes wurden die nachfolgend aufgeführten Sprühreagentien erprobt:

- |                                                                 |                     |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------|
| A. <u>Cer(IV)-sulfat-Schwefelsäure</u>                          | STAHL Nr. 4         |
| B. <u>Chrom-Schwefelsäure</u>                                   | STAHL Nr. 34        |
| C. <u>Diazotierung und Kupplung</u><br><u>mit beta-Naphthol</u> | STAHL Nr. 39        |
| D. <u>Echtblausalz B</u>                                        | STAHL Nr. 61        |
| E. <u>Glucose-Phosphorsäure</u>                                 | STAHL Nr. 66        |
| F. <u>Ninhydrin für Amine</u>                                   | STAHL Nr. 108       |
| G. <u>Nitroprussid-Na + <math>\text{CH}_3\text{CHO}</math></u>  | STAHL Nr. 112       |
| H. <u>Salpetersäure</u>                                         | STAHL Nr. 132       |
| I. <u>Schwefelsäure</u>                                         | STAHL Nr. 134       |
| J. <u>Vanillin</u>                                              | STAHL Nr. 147       |
| K. <u>CSAKY-Reagens</u>                                         | HAIS-MACEK Nr. D113 |
| L. <u>p-Dimethylaminobenzaldehyd</u>                            | HAIS-MACEK Nr. D114 |
| M. <u>Stabilisiertes Diazoniumsalz</u>                          | HAIS-MACEK Nr. D122 |
| N. <u>10%ige Eisenchloridlösung</u>                             |                     |
| O. <u>Echtblausalz RR + <math>\text{Na}_2\text{CO}_3</math></u> |                     |
| P. <u>DRAGENDORFF's Reagens</u>                                 |                     |
| Q. <u>Reagens nach DRESSLER</u>                                 |                     |
| R. <u>Sprühlösung I</u>                                         |                     |

Alle diese Sprühreagentien, ausgenommen Cer(IV)-sulfat-Schwefelsäure, ergaben keine Farbreaktion mit dem VALIUM-Abbauprodukt 2-Methylamino-5-chlor-benzophenon.

Entgegen den Angaben von STAHL (Nr.4) verblaßte die Anfärbung des VALIUM-Abbauproduktes auf dem Dünnschichtchromatogramm, nachdem es mit Cer(IV)-sulfat-Schwefelsäure besprüht und im Trockenschrank erhitzt worden war. Ohne Erwärmen waren die Substanzflecke auf der Kieselgel G-Platte von 1-9  $\mu\text{g}$  VALIUM-Hydrolysat gut zu erkennen, nach 24h nur noch die über 5  $\mu\text{g}$ . Auf dem Dünnschichtchromatogramm mit den Substanzmengen von 0.1-0.9  $\mu\text{g}$  waren die Farbflecke von 0.4  $\mu\text{g}$  an nur kurz nach dem Besprühen sichtbar. Die Flecke verblaßten sehr schnell, nach Wärmebehandlung sofort.

Einen empfindlicheren Nachweis lieferte das Verhalten des VALIUM-Abbauproduktes im UV-Licht von 366 mp.

Bei dieser Wellenlänge zeigten die aufgebraachten Substanzmengen auf beiden Dünnschichtchromatogrammen eine starke grünliche Fluoreszenz. Sie war von 0.1  $\mu\text{g}$  an deutlich zu erkennen.

Von Nachteil dabei ist, daß die Fluoreszenz bei sehr geringen Mengen aufgetragener Substanz erst nach etwa 12-14 Stunden erscheint. Der Versuch, sie durch Aufsprühen von starken Oxydationsmitteln wie Wasserstoffperoxyd oder konzentrierte Salpetersäure zu verstärken, führte nicht zu dem gewünschten Ergebnis.

## II. Hauptversuche

### Isolierung der Benzophenonderivate aus dem Blut

(Modellversuche mit Konserven-Blut)

Um die zeitraubende Säurehydrolyse zu umgehen, wurde versucht, die Benzophenonderivate mit Hilfe einer speziellen Salzmischung (nach BERG) aus dem Blut zu isolieren.

#### Ansatz:

Zu 7.5 ml Konserven-Blut wurden 20  $\mu\text{g}$  2-Amino-5-chlor-benzophenon zugemischt. Dazu wurden noch 7.5 ml Aqua bidest. einpipettiert und 5.0 g der folgenden Salzmischung (nach BERG) zugesetzt:

62.5 g wasserfreies  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  + 20.89 g  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$   
(oder 10.0 g  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 1 \text{H}_2\text{O}$ ).

Ausäthern und Einengen des Extraktes wurde in der gleichen Weise wie bei den vorigen Versuchen vorgenommen. Nach Anfertigen eines Dünnschichtchromatogramms und Besprühen mit Sprühreagens I war das in das Konservenblut eingebrachte LIBRIUM-Hydrolysat deutlich durch den intensiv rot-violetten Farbfleck mit einem  $R_f$ -Wert von 0.31 nachweisbar.

In einem zweiten Versuch wurde die Menge des Konserven-Blutes auf 5.0 ml herabgesetzt, und nur noch 10  $\mu\text{g}$  LIBRIUM-Hydrolysat zugemischt. In entsprechender Weise wurde die Menge des zur Verdünnung benötigten Aqua bidest. auf 5.0 ml reduziert, und nur noch 3.5 g der oben angegebenen Salzmischung zugesetzt.

Auch diese geringe Menge 2-Amino-5-chlor-benzo-phenon ließ sich nachweisen.

Bei diesem Isolierungsverfahren traten beim Ausäthern des zähflüssigen Blut-Salzgemisches große mechanische Schwierigkeiten auf, die den Zeitbedarf für die Extraktion erheblich vergrößerten. Die Durchlaßöffnung des Scheidetrichters war oft verstopft, und die Trennung der Phasen nur sehr schwer und unvollständig zu erreichen, so daß bei den folgenden Versuchen auf dieses Extraktionsverfahren verzichtet wurde.

Stattdessen wurde das Blut mit 2n Salzsäure unter Rückfluß hydrolysiert, mit 2n Natriumhydroxyd alkalisiert, und dann mit Hilfe von Äther die gebildeten Aminobenzophenonderivate abgetrennt.

#### Verkürzung der Hydrolysezeit

Die in der Literatur angegebene Hydrolysedauer von 120 min erschien wesentlich länger als erforderlich. Deshalb wurde in einem Reihenversuch nach dem unten angegebenen Ansatz die jeweilige Hydrolysezeit zwischen 15 min und 120 min variiert:

15 min - 30 min - 45 min - 60 min - 90 min - 120 min.

Außerdem wurden von der LIBRIUM- und VALIUM-Reinsubstanz Standardlösungen mit einem Gehalt von 4-2-1 und 0,5 µg/ml hergestellt. VALIUM-Reinsubstanz ließ sich erst nach Zusatz von 1% konzentrierter Salzsäure in Lösung bringen.

Ansatz:

5.0 ml Konserven-Blut,

3.0 ml konzentrierte Salzsäure,

5.0 ml LIBRIUM-Standardlösung (Gehalt: 4  $\mu\text{g/ml}$ ).

Die einzelnen Hydrolysate wurden genau nach dem gleichen Verfahren behandelt, und die so erhaltenen Extrakte auf ein Chromatogramm aufgetragen, entwickelt und angefärbt. Dabei zeigte sich, daß 15 min Kochen mit 2n Salzsäure ausreicht, um alles LIBRIUM in 2-Amino-5-chlorbenzophenon zu überführen.

Ein Parallellversuch unter gleichen Bedingungen mit 20  $\mu\text{g}$  VALIUM erbrachte ein gleiches Ergebnis.

Die Frage, welche Mengen LIBRIUM oder VALIUM in 5.0 ml Blut dünnstichtchromatographisch noch nachgewiesen werden können, wurde durch folgende Versuche geklärt.

Es wurden 4 Ansätze hergestellt, die je 5.0 ml LIBRIUM- oder VALIUM-Standardlösungen enthielten. Diese wurden 15 min gekocht und nach dem Abkühlen mit je 25 ml 2n Natriumhydroxyd stark alkalisch gemacht. Die Messungen mit dem pH-Meter ergaben Werte zwischen pH 11.2-11.3. Extraktion, Abdestillation und Einengen der Abbauprodukte wurde wie in den früheren Versuchen vorgenommen. Chromatographiert wurde auf Kieselgel G-Platten.

Die Auswertung der Chromatogramme zeigte, daß selbst 2.5  $\mu\text{g}$  LIBRIUM oder VALIUM in 5.0 ml Blut nach Säurehydrolyse über ihre Abbauprodukte noch einwandfrei dünnstichtchromatographisch nachgewiesen werden können.

Der Einfluß des pH-Wertes der Hydrolysate  
auf Menge und Reinheit der Extrakte

Zur Prüfung der Frage, ob die Alkalität des Reaktionsgemisches einen Einfluß auf Menge und Reinheit der Ätherextrakte ausübt, wurden noch einmal 4 Proben angesetzt, die 20-10-5-2.5 µg LIBRIUM oder VALIUM enthielten. Nach 15 min Kochen wurde abgekühlt und im Gegensatz zu den vorigen Versuchen nur schwach alkalisch gemacht. Die mit dem pH-Meter ermittelten Werte lagen zwischen pH 8-8.5.

Beim Vergleich der Substanzflecken auf den Dünnschichtchromatogrammen stellte sich heraus, daß bei den stark alkalisch gemachten Ansätzen größere und besser abgesetzte Substanzflecke erzielt wurden als bei den nur schwach alkalisch gemachten.

Verunreinigungen aus dem biologischen Material beeinflussen unter Umständen die  $R_f$ -Werte der oft nur in Spuren vorhandenen und nachzuweisenden Substanzen. Die Identifizierung eines bestimmten Stoffes kann dadurch erheblich erschwert werden. Derartige Schwierigkeiten ergaben sich auch bei dem Nachweis der Abbauprodukte von LIBRIUM und VALIUM mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie. Bessere Ergebnisse wurden dadurch erzielt, daß die stark alkalisch gemachten Hydrolysate erst nach 12-14 Stunden Stehen mit Äther extrahiert wurden. Der Substanzfleck auf dem Dünnschichtchromatogramm erschien

dann rund bis oval und nicht durch mitwandernde Verunreinigungen U-förmig verzogen. Der  $R_f$ -Wert lag exakt in der gleichen Höhe wie die mitgelaufene Testsubstanz.

### III. Die vorgeschlagene optimale Methodik

Durch Differenzwägung wird die vorhandene Blutmenge bestimmt. Zu 5.0 ml Blut werden in einem nichtgefetteten<sup>1)</sup> 50 ml-Schliffkolben 5.0 ml Aqua bidest. und 3.0 ml konzentrierte Salzsäure gegeben; der Schliffkolben wird mit einem Rückflußkühler versehen, langsam zum Sieden erhitzt und 15 min bei Siedetemperatur gehalten. Dann entfernt man den Kühler und fügt nach Abkühlen des Kolbens in Eiswasser unter Rühren 25.0 ml 2n Natronlauge zu. Der pH-Wert stellt sich dabei auf 11-11.5 ein (bei wesentlich größeren Blutmengen erhöht sich der Laugenzusatz entsprechend). Die in Freiheit gesetzten Amine können sofort oder nach einer Wartezeit<sup>2)</sup> durch dreimaliges Ausschütteln mit je 70.0 ml<sup>3)</sup> peroxydfreiem Äther extrahiert werden. Die vereinigten Ätherphasen werden wie üblich mit geglühtem, wasserfreiem Natriumsulfat entwässert und durch Destillation auf einem Wasserbad eingeeengt.

Chromatographiert wird auf Kieselgel G-Platten von 0.25 mm Streichdicke nach 5 min Aktivieren im Trockenschrank bei 110° C<sup>4)</sup>.

Durch 30 min Konditionierung im Dampfraum über dem Fließmittel wird eine Verbesserung der Laufeigenschaften erreicht. Fließmittel ist reines Benzol.

Nach 30-40 min ist die erforderliche Laufstrecke von 15 cm erreicht, und die Platte kann aus der Trennkammer genommen und getrocknet werden.

Die Platte wird darauf so abgedeckt, daß nur die Fläche von Startlinie bis etwa  $R_F = 0.4^{5)}$  mit dem Reagens I besprüht werden kann, die Platte darüber aber unbehandelt bleibt, so daß diese Fläche später unter dem UV-Licht betrachtet oder mit einem weiteren Sprühreagens behandelt werden kann.

#### Sprühreagens I:

##### Lösung A:

5.0 ml tert. Butylnitrit (FLUKA),

2.5 ml n-Butanol,

0.5 ml Eisessig

werden jeweils frisch gemischt und auf die trockene Platte gesprüht. Diese wird dann nach einer Reaktionszeit von 2-3 min nachgesprüht mit

##### Lösung B:

20 mg N-(1-Naphthyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid,

20 ml n-Butanol,

1 ml 2n Salzsäure.

Es entstehen violette Flecke auf weißem Grund. Die Nachweisgrenze für LIBRIUM liegt bei 0.1 Mikrogramm und darunter.

Mit Hilfe der sehr ausgeprägten hellblauen Fluoreszenz läßt sich auch das VALIUM-Abbauprodukt mit UV-Licht von 366 m $\mu$  bei einem R<sub>F</sub>-Wert von 0.55-0.59 bis zu 0.1  $\mu$ F nachweisen.

#### Bemerkungen

(1) Fett stört, da es später mitextrahiert wird, durch negative Beeinflussung der R<sub>F</sub>-Werte. (2) Nach 20-40 stündigem Stehen werden sehr reine Ätherextrakte erhalten. (3) Geringere Äthermengen verursachen häufig schwierig zu trennende Emulsionen. (4) Die Aktivierungszeit beeinflusst die R<sub>F</sub>-werte. Deshalb sollten stets Testsubstanzen im Dünnschichtchromatogramm mitlaufen. (5) Bei Verwendung von 2-Amino- und 2-Methylamino-5-chlor-benzonkenon als Testsubstanzen läßt sich die Trennlinie unter dem UV-Licht genau festlegen.

#### IV. Probandenversuche

Nach der eben angegebenen Methode wurden 58 Blutproben von 6 Versuchspersonen, die unterschiedlich hohe Dosen dieser Medikamente eingenommen hatten, auf LIBRIUM und VALIUM untersucht.

Versuchsperson I = 2 x 10 mg LIBRIUM-10-ROCHE

Versuchsperson II = 2 x 10 mg VALIUM-10-ROCHE

Versuchsperson III = 1 x 10 mg LIBRIUM-10-ROCHE

Versuchsperson IV = 1 x 10 mg LIBRIUM-10-ROCHE +

1 x 10 mg VALIUM-10-ROCHE

Versuchsperson V = 3 x 10 mg VALIUM-10-ROCHE

Versuchsperson VI = 6 x 10 mg LIBRIUM-10-ROCHE

Die Blutproben wurden bis 12h nach oraler Aufnahme in Abständen von 2h, danach in Abständen von 12h aus

einer Armvene entnommen, und ohne einen Zusatz bis zur Hydrolyse im Kühlschrank aufbewahrt. Die bei jeder Venenpunktion abgenommene Blutmenge betrug 8-12 ml. Davon wurden bei allen Untersuchungen nur 5.0 ml hydrolysiert, der Rest wurde für Lagerungsversuche aufbewahrt. Eine Ausnahme bilden die in der Tabelle Ib aufgeführten Ergebnisse. Diese wurden nach Hydrolyse von nur 2.0 ml Blut der Versuchsperson I gewonnen.

Alle Erstuntersuchungen wurden spätestens 4 Tage nach der letzten Blutentnahme vorgenommen. Die Ergebnisse sind in den Tabellen I-VI zusammengefasst.

Je nach Stärke der Farbreaktion nach Besprühen mit Sprühreagens I oder der Intensität der Fluoreszenz im UV-Licht (366 m $\mu$ ) wurden 5 Abstufungen vermerkt.

Es bedeutet:

+ + + + = sehr starke,

+ + + = starke,

+ + = gut erkennbare,

+ = schwach erkennbare,

(+) = bedingt erkennbare,

Ø = keine Farbreaktion oder Fluoreszenz.

V e r s u c h Ia: 2 x 10 mg LIBRIUM-10-ROCHE

Versuchsperson R.B.; 25J.; ♂; 78kg

| D a t u m | Z e i t          | Blutentnahme nach | Nachweis |
|-----------|------------------|-------------------|----------|
| 28.8.1967 | 8 <sup>00</sup>  | Einnahme          | ∅        |
| "         | 10 <sup>00</sup> | 2 h               | + + +    |
| "         | 12 <sup>00</sup> | 4 h               | + + +    |
| "         | 14 <sup>00</sup> | 6 h               | + + +    |
| "         | 16 <sup>00</sup> | 8 h               | + + +    |
| "         | 18 <sup>00</sup> | 10 h              | + + +    |
| "         | 20 <sup>00</sup> | 12 h              | + + +    |
| 29.8.1967 | 8 <sup>00</sup>  | 24 h              | + +      |
| "         | 20 <sup>00</sup> | 36 h              | + +      |
| 30.8.1967 | 8 <sup>00</sup>  | 48 h              | + +      |
| "         | 20 <sup>00</sup> | 60 h              | +        |
| 31.8.1967 | 8 <sup>00</sup>  | 72 h              | +        |

V e r s u c h I b: 2 x 10 mg LIBRIUM-10-ROCHE (2 ml Blut)

Versuchsperson wie Ia;

| D a t u m | Z e i t          | Blutentnahme nach | Nachweis |
|-----------|------------------|-------------------|----------|
| 28.8.1967 | 8 <sup>00</sup>  | Einnahme          | Ø        |
| "         | 10 <sup>00</sup> | 2 h               | + +      |
| "         | 12 <sup>00</sup> | 4 h               | + +      |
| "         | 14 <sup>00</sup> | 6 h               | + +      |
| "         | 16 <sup>00</sup> | 8 h               | +        |
| "         | 18 <sup>00</sup> | 10 h              | +        |
| "         | 20 <sup>00</sup> | 12 h              | +        |
| 29.8.1967 | 8 <sup>00</sup>  | 24 h              | (+)      |
| "         | 20 <sup>00</sup> | 36 h              | (+)      |
| 30.8.1967 | 8 <sup>00</sup>  | 48 h              | Ø        |
| "         | 20 <sup>00</sup> | 60 h              | Ø        |
| 31.8.1967 | 8 <sup>00</sup>  | 72 h              | Ø        |

V e r s u c h   II:   2 x 10 mg VALIUM-10-ROCHE

Versuchsperson H.-D.B.; 23J.; ♂; 67kg

| D a t u m | Z e i t          | Blutentnahme nach | Nachweis |
|-----------|------------------|-------------------|----------|
| 29.8.1967 | 8 <sup>00</sup>  | Einnahme          | Ø        |
| "         | 10 <sup>00</sup> | 2 h               | + +      |
| "         | 12 <sup>00</sup> | 4 h               | + + +    |
| "         | 14 <sup>00</sup> | 6 h               | + + +    |
| "         | 16 <sup>00</sup> | 8 h               | + +      |
| "         | 18 <sup>00</sup> | 10 h              | +        |
| "         | 20 <sup>00</sup> | 12 h              | +        |
| 30.8.1967 | 8 <sup>00</sup>  | 24 h              | +        |
| "         | 20 <sup>00</sup> | 36 h              | (+)      |
| 31.8.1967 | 8 <sup>00</sup>  | 48 h              | (+)      |
| "         | 20 <sup>00</sup> | 60 h              | Ø        |
| 1.9.1967  | 8 <sup>00</sup>  | 72 h              | Ø        |

V e r s u c h   I I I :   1 x 10 mg LIBRIUM-10-ROCHE

Versuchsperson W.S.; 24J.; ♂; 73kg

| D a t u m | Z e i t          | Blutentnahme nach | Nachweis |
|-----------|------------------|-------------------|----------|
| 25.9.1967 | 8 <sup>00</sup>  | Einnahme          | Ø        |
| "         | 10 <sup>00</sup> | 2 h               | + + +    |
| "         | 12 <sup>00</sup> | 4 h               | + + +    |
| "         | 14 <sup>00</sup> | 6 h               | + + +    |
| "         | 16 <sup>00</sup> | 8 h               | + +      |
| "         | 18 <sup>00</sup> | 10 h              | + +      |
| "         | 20 <sup>00</sup> | 12 h              | + +      |
| 26.9.1967 | 8 <sup>00</sup>  | 24 h              | +        |
| "         | 20 <sup>00</sup> | 36 h              | +        |
| 27.9.1967 | 8 <sup>00</sup>  | 48 h              | +        |
| "         | 20 <sup>00</sup> | 60 h              | +        |
| 28.9.1967 | 8 <sup>00</sup>  | 72 h              | +        |

V e r s u c h   I V:   1 x 10 mg LIBRIUM-10-ROCHE +

1 x 10 mg VALIUM-10-ROCHE

Versuchsperson H.A.; 24J.; ♂; 61kg

| Datum   | Zeit             | Blutentnahme nach | Nachweis |        |
|---------|------------------|-------------------|----------|--------|
|         |                  |                   | LIBRIUM  | VALIUM |
| 25.9.67 | 8 <sup>00</sup>  | Einnahme          | ∅        | ∅      |
| "       | 10 <sup>00</sup> | 2 h               | + + +    | + +    |
| "       | 12 <sup>00</sup> | 4 h               | + + +    | + + +  |
| "       | 14 <sup>00</sup> | 6 h               | + +      | + +    |
| "       | 16 <sup>00</sup> | 8 h               | + +      | +      |
| "       | 18 <sup>00</sup> | 10 h              | + +      | +      |
| "       | 20 <sup>00</sup> | 12 h              | + +      | (+)    |
| 26.9.67 | 8 <sup>00</sup>  | 24 h              | +        | ∅      |
| "       | 20 <sup>00</sup> | 36 h              | +        | ∅      |
| 27.9.67 | 8 <sup>00</sup>  | 48 h              | +        | ∅      |
| "       | 20 <sup>00</sup> | 60 h              | +        | ∅      |
| 28.9.67 | 8 <sup>00</sup>  | 72 h              | (+)      | ∅      |

V e r s u c h V: 3 x 10 mg VALIUM-10-ROCHE

Versuchsperson U.M.; 20J.; ♀; 53kg

| D a t u m | Z e i t          | Blutentnahme nach | Nachweis |
|-----------|------------------|-------------------|----------|
| 30.9.1967 | 8 <sup>00</sup>  | Einnahme          | Ø        |
| "         | 10 <sup>00</sup> | 2 h               | + +      |
| "         | 12 <sup>00</sup> | 4 h               | + + +    |
| "         | 14 <sup>00</sup> | 6 h               | + + +    |
| "         | 16 <sup>00</sup> | 8 h               | + + +    |
| "         | 18 <sup>00</sup> | 10 h              | + +      |
| "         | 20 <sup>00</sup> | 12 h              | + +      |
| 1.10.1967 | 8 <sup>00</sup>  | 24 h              | + +      |
| "         | 20 <sup>00</sup> | 36 h              | + +      |
| 2.10.1967 | 8 <sup>00</sup>  | 48 h              | +        |
| "         | 20 <sup>00</sup> | 60 h              | +        |
| 3.10.1967 | 8 <sup>00</sup>  | 72 h              | +        |

V e r s u c h VI: 6 x 10 mg LIBRIUM-10-ROCHE

Versuchsperson G.K.; 38J.; ♂; 96kg

| D a t u m | Z e i t          | Blutentnahme nach | Nachweis |
|-----------|------------------|-------------------|----------|
| 30.9.1967 | 8 <sup>00</sup>  | Einnahme          | Ø        |
| "         | 10 <sup>00</sup> | 2 h               | + + +    |
| "         | 12 <sup>00</sup> | 4 h               | + + + +  |
| "         | 14 <sup>00</sup> | 6 h               | + + + +  |
| "         | 16 <sup>00</sup> | 8 h               | + + + +  |
| "         | 18 <sup>00</sup> | 10 h              | + + +    |
| "         | 20 <sup>00</sup> | 12 h              | + + +    |
| 1.10.1967 | 8 <sup>00</sup>  | 24 h              | + + +    |
| "         | 20 <sup>00</sup> | 36 h              | + + +    |
| 2.10.1967 | 8 <sup>00</sup>  | 48 h              | + + +    |
| "         | 20 <sup>00</sup> | 60 h              | + +      |
| 3.10.1967 | 8 <sup>00</sup>  | 72 h              | + +      |
| "         | 20 <sup>00</sup> | 84 h              | + +      |
| 4.10.1967 | 8 <sup>00</sup>  | 96 h              | +        |
| 5.10.1967 | 8 <sup>00</sup>  | 120 h             | +        |
| 6.10.1967 | 8 <sup>00</sup>  | 144 h             | +        |

### C. Zusammenfassung

Einleitend wird eine gedrängte Übersicht über Chemie und Pharmakologie der Psychopharmaca, besonders der Benzodiazepinderivate LIBRIUM und VALIUM gegeben, sowie ihre bisher beschriebenen Nachweismethoden. Es wird so= dann über ausgedehnte Vorversuche zur Darstellung der Säurehydrolysate von LIBRIUM und VALIUM mit papier- und dünnschichtchromatographischer Differenzierung der Hydro= lysenprodukte berichtet (Reinigung, Schmelzpunktbestimm= ung). Als unterste Nachweisgrenze wurde für die beiden gereinigten Abbauprodukte 0.1 µg gefunden.

Im Hauptteil der Arbeit wurde die Isolierung der Benzophenonderivate aus kleinen Blutmengen angestrebt. Die Hydrolysedauer konnte von 120 auf 15 min gesenkt werden. Mit der als optimal erarbeiteten Technik konnten noch 2.5 µg LIBRIUM oder VALIUM in 5.0 ml Blut dünn= schichtchromatographisch nachgewiesen werden. In 88 untersuchten Blutproben von 6 Probanden gelang der Nach= weis bis zu 6 Tagen nach einer einmaligen Einnahme von LIBRIUM oder VALIUM. Die optimale Methode wird genau an= gegeben.

D. Literatur

BÄUMLER, J., V. GANDER und J. IM OBERSTEG: Zur chemisch-toxikologischen Charakterisierung des Psycho-pharmacons LIBRIUM. Beitr. gerichtl. Med. 22, 10 (1963)

BÄUMLER, J. und S. RIPPSTEIN: Über den Nachweis von Methaminodiazepoxyd (LIBRIUM) und seiner Metaboliten. Helv. Chim. Acta 44, 2208 (1961)

BERG, S.: Physiologisch-chemische Befunde im Leichenblut als Ausdruck des Todesgeschehens. Z. gerichtl. Med. 54, 136 (1963)

DITT, J. und R. PAUER: Die verkehrsmedizinische Bedeutung von LIBRIUM mit und ohne gleichzeitiger Alkoholbelastung. Vortr. 42. Tagg. Ges. gerichtl. Med., München 1963

DRESSLER, A.: Ein papierchromatographischer Nachweis von 2,4-Dioxo-3,3-diäthyl-5-methylpiperidin (Noludar, methypylon). Arch. Toxikol. 17, 293 (1959)

KIELHOLZ, P., L. GOLDBERG, J. IM OBERSTEG, W. POEL-DINGER, A. RAMSEYER und P. SCHMID: Straßenverkehr, Tranquillizer und Alkohol. Dtsch. med. Wschr. 35, 1525 (1967)

KOECHLIN, B. and L. D'ARCONTE: Determination of Chlordiazepoxide (LIBRIUM) and of a Metabolite of Lac-tam Character in Plasma of Humans, Dogs, and Rats by a Specific Spectrofluorometric Micro Method. Anal. Biochem. 5, 195 (1963)

KOECHLIN und SCHWARTZ: zit. nach PRIBILLA

KUSCHINSKI, G. und H. LÜLMANN: Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie, 3 Stuttgart (Thieme) 1967

LANGNER, H.: Ein Nachweis von „Ro 5 - 2807“, einem neuen Psychopharmakon aus der Benzodiazepinreihe. Z. analyt. Chem. 202, 1, 28 (1964)

OELSCHLÄGER, H.: Über das polarographische Verhalten des Chlordiazepoxids (LIBRIUM). Arch. Pharmakol. 296, 6, 396-403 (1963)

OELSCHLÄGER, H., J. VOLKE und E. KUREK: Polarographische Gehaltsbestimmung des Diazepam (VALIUM-ROCHE). Arch. Pharmakol. 297, 7, 431-442 (1964)

PRIBILLA, O.: Chlordiazepoxyd-Studien zum Nachweis der Ausscheidung beim Menschen. *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)* 14, 723 (1964)

RANDALL, SCHALLEK, HEISE, KEITH und BAGDON: zit. nach PRIBILLA

RANDALL, L., W. SCHALLEK, C. SCHECKEL, R. BANZIGER, A. BORIS, R. MOE, R. BAGDON, M. SCHWARTZ und G. ZBINDEN: Zur Pharmakologie von VALIUM, einem neuen Psychopharmakon der Benzodiazepinreihe. *Schweiz. med. Wschr.* 93, 794 (1963)

SILVA, J. de, M. SCHWARTZ, V. STEFANOVIC, J. KAPLAN und L. D'ARCONTE: Determination of Diazepam (VALIUM) in Blood by Gas Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* 36, 2099 (1964)

STERNBACH, L., S. KAISER and E. REEDER: Quinazoline 3-Oxide Structure of Compounds Previously Described in the Literature as 3,1,4-Benzoxadiazepines. *J. Amer. Chem. Soc.* 82, 475 (1960)

STERNBACH, L. and E. REEDER (1): Quinazolines and 1,4-Benzodiazepines. II. The Rearrangement of 6-Chloro-2-chloromethyl-4-phenylquinazoline 3-Oxide into 2-Amino Derivatives of 7-Chloro-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepine 4-Oxide. *J. Org. Chem.* 26, 1111 (1961)

STERNBACH, L. and E. REEDER (2): Quinazolines and 1,4-Benzodiazepines. IV. Transformations of 7-Chloro-2-methylamino-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepine 4-Oxide. *J. Org. Chem.* 26, 4936 (1961)

TSCHUDI-STEINER, I.: Nebenwirkungen von Arzneimitteln. *Schweiz. Apoth.-Ztg.* 99, 765 (1961)

WEIST, F. und E. SCHMID: Zum dünnsschichtchromatographischen Nachweis verschiedener Benzodiazepin- und Dibenazepinderivate. *Vortr. 46. Tagg. Ges. gerichtl. Med., Kiel* 1967

ZBINDEN, G., R. BAGDON, E. KEITH, R. PHILIPPS und L. RANDALL: Experimental and Clinical Toxicology of Chlordiazepoxide (LIBRIUM). *Tox. appl. Pharm.* 3, 619 (1961)

---

Die Angaben für die einzelnen Sprühreagentien wurden dem Laboratoriumshandbuch für Dünnschichtchromatographie von STAHL, E., 1 Berlin (Springer) 1962 und dem Handbuch der Papierchromatographie von HÄIS, I.M. und K. MACEK, 1 Leipzig (VEB Gustav Fischer) 1960 entnommen.

Für die Überlassung des Themas und für die Unterstützung beim Aufbau der Arbeit bin ich Herrn Professor Dr. F. Schleyer zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Professor Dr.M. Siess

danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Für viele Anregungen bin ich Herrn Dipl.-Chemiker G. Kamm, Institut für gerichtliche Medizin der Universität Marburg, besonders dankbar.

### Lebenslauf

Am 17.September 1942 wurde ich in Rasdorf/Kreis Hünfeld geboren. Nach fünfjährigem Besuch der Grundschule in Rasdorf wurde ich Ostern 1954 in die Sexta des Wigbert-Gymnasiums in Hünfeld aufgenommen. Die Reifeprüfung legte ich an derselben Schule am 13.Februar 1963 ab. Im Sommersemester 1963 begann ich mein Medizinstudium an der Philipps-Universität in Marburg an der Lahn. Das Vorphysikum bestand ich im Frühjahr 1964, das Physikum im Herbst 1965. In allen Semestern war ich in Marburg immatrikuliert. Am 16.Juli 1968 habe ich mit dem Staatsexamen begonnen. Es endete am 16.Dezember 1968.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren:

BECKMANN, BERENDES, BRAUN-FALCO, BRÜCK, BUCHHOLZ, DIMROTH,  
DITTRICH, DRAWERT, EHRHARDT, EXNER, GEDIGK, GOLENHOFEN,  
HAMM, HENSEL, HESS, HEUSER, HILDEBRANDT, JACOB, KARLSON,  
KNAUFF, LANG, LINNEWIEH, LÖHR, MAHR, MANN, MARTINI, MARX,  
MATTES, du MESNIL DE ROCHEMENT, PETRY, PRINZ, RODECK,  
RODENHÄUSER, ROHEN, SCHLEYER, SCHMID, SCHRAPPE, SCHWAIGER,  
SEIDEL, SIEGERT, SIESS, STRAUB, STREICHER, WALCHER, WENDT,  
WÜRTERLE.







